

A SZINAPTIKUS TRANSZMISSZIÓ MODULÁCIÓJA A DISZTÁLIS RETINÁBAN

PhD értekezés tézisei

Rábl Katalin

Pécs, 2003

I. BEVEZETÉS

A retina az embrionális fejlődés során az előagyhólyagból kialakuló, a szem hátsó falával belülről érintkező többrétegű idegszövet, melyben a fényfelfogás és fényfeldolgozás első alapvető lépései játszódnak le. A gerinces retina konzervatív szerkezetű, a neuronok sejtestjei három rétegbe rendeződnek, melyeket két szinaptikus réteg választ el. Disztálisan, a pigment epitheliumhoz szorosan kapcsolódnak a fotoreceptorok külső szegmentumai, sejtestjeik pedig a külső magvas réteget alkotják. A fotoreceptorok a másodlagos neuronok (a bipoláris és horizontális sejtek) nyúlványaival szinaptizálnak a külső rostos rétegben. A bipoláris és horizontális sejtek, a harmadlagos neuronok közül az amakrin sejtek, valamint a retina fő gliafélesége (Müller sejtek) perikarionjai képezik a belső magvas réteget. A belső rostos rétegben az amakrin, bipoláris és ganglionsejtek létesítenek szinaptikus kapcsolatot. Az előző két sejtípus egymáshoz képest lehet pre- és posztszinaptikus pozícióban is, valamint az amakrin sejtek gyakran szinaptizálhatnak egymással, azonban a ganglionsejtek nyúlványai kizárólag posztszinaptikusan helyezkedhetnek el. A legbelső magvas réteg a dúcsejtek rétege, mely a ganglionsejtek és az ún. displaced amakrin sejtek perikarionjait tartalmazza. A ganglionsejtek axonjai alkotják az optikus rostok rétegét, ezen axonok a szemből kilépve a látóideget képezik.

Kísérleteink során a disztális retinában található sejteken (fotoreceptorok, horizontális sejtek) vizsgáltuk a szinaptikus transzmisszió modulációjának lehetőségeit.

A neuronok közötti információátadás a szinapszisokon keresztül valósulhat meg, a szinapszis lehet kémiai vagy elektromos. Kémiai szinapszis esetében a preszinaptikus neuron által szekretált neurotranszmittert a posztszinaptikus neuron detektálja. A központi idegrendszer szinapszisaiban a transzmitter-felszabadulás rövid (kb. 1 ms) depolarizáló feszültségimpulzusok, az akciós potenciálok által indukált. Az axonterminális depolarizációja feszültségfüggő Ca-csatornákat nyit, melynek következtében elektrokémiai grádiensük mentén Ca-ionok áramlanak a terminálisba. A konvencionális szinapszisokhoz hasonlóan, a neurotranszmitter-felszabadulás a szalagszinapszisban is a transzmittert tartalmazó szinaptikus vezikulák plazmamembránnal való Ca-függő fúziója által mediált. A fúziót követő endocitózis során a szinaptikus vezikula membránja visszanyerődik és a terminálisban újraalakulnak a transzmitter-töltött vezikulák. A fotoreceptorok – eltérően a központi idegrendszer neuronjaitól – szalagszinapszissal rendelkeznek.

A retinában az összes feszültségfüggő Ca²⁺-csatorna-típus, azaz P/Q-, N-, R-, T-, L-típus megtalálható. Kételtű és emlős retinán folytatott immuncitokémiai és elektrofiziológiai vizsgálatok szerint a fotoreceptorok belső szegmentuma főleg L-típusú feszültségfüggő Ca²⁺-csatornákat tartalmaz. Tehát ezen csatornák gátlhatók dihidropiridin-típusú blokkolókkal, mint nifedipin és nimodipin, továbbá az L-típusú csatorna agonista Bay K 8644 jelentős Ca²⁺-áram növekedést okoz. Azonban a fotoreceptorok Ca²⁺-csatornái különböznek az „általános” L-típusú csatornáktól (szív- és vázizom Ca²⁺-csatornái), pl.: a fotoreceptorok csatornái negatívabb aktivációs küszöbvel bírnak (-45 – -60 mV), valamint kevésbé szenzitívek a dihidropiridin-típusú blokkolókra, így nifedipinre.

A központi idegrendszer, valamint annak része, a retina elsődleges excitatoros neurotranszmittere a glutamát. A glutamáterg szinaptikus transzmisszió terminációjához szükséges glutamátfelvétel feladatát a plazmamembrán glutamát transzporterei látják el, melyek mind a neuronokban, mind a gliasejtekben megtalálhatók. A glutamátfelvétel másik fontos feladata az idegrendszerben a magas extracelluláris glutamátkoncentráció kialakulásának megakadályozásával a sejtek védelme a glutamát-indukált excitotoxicitástól.

Szalamandra retinából öt különböző glutamát transzportert klónoztak: sEAAT1, sEAAT2A, sEAAT2B, sEAAT5A és sEAAT5B, melyek a hasonló elnevezésű humán retinális transzporterek homológjai. Ezek mindegyike – az sEAAT2B kivételével – megtalálható a fotoreceptorokban. A glutamátfelvétel ligandszenzitivitása különböző lehet a pálcikákban és a csapokban, ezen eltérés a fajok között is fennáll. A fotoreceptorokban a glutamát-kiváltott áramok jelentős részben kloridáramoknak bizonyultak. A glutamát-kiváltott áramok a fotoreceptorok terminális régiójában mutatkoztak a legnagyobbak, tehát a glutamát transzporterek nagy valószínűséggel itt fordulnak elő legkoncentráltabban.

A retinális sejtek működését számos endogén neurotranszmitter és ion módosíthatja. A transzmitterek hatásukat – pl.: az általunk tanulmányozott fotoreceptorok L-típusú Ca^{2+} -csatornáira – nem közvetlenül, hanem másodlagos messenger-rendszerek közreműködésével fejtik ki, míg az ionok direkt módon befolyásolhatják a sejtműködést. Az L-típusú Ca^{2+} -csatornák aktiválása alapfeltétele a transzmitter felszabadulásnak, ezért ezen ioncsatornák megfelelő szabályozása különösen fontos. Moduláló hatást gyakorolhatnak pl.: a Cl^- , PO_4^{3-} , Zn^{2+} ; a transzmitterek közül a dopamin, nitrogén-oxid, somatostatin, adenzin.

Az endogén neuroprotektív anyagoknak nem csak a retina fejlődésében, hanem az kifejlett retinát ért neurodegeneratív hatások kompenzációjában is jelentős szerepük van. Ilyen neuroprotektív faktorok lehetnek, pl.: a PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), VIP (vasoactive intestinal peptide), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) valamint a LEDGF (lens-epithelium derived growth factor).

A PACAP-ot először juh agyból izolálták, mint addig ismeretlen hipotalamikus hormont, mely az adenilát-cikláz enzim aktiválásával jelentősen növelte a ciklikus AMP (cAMP) képződését patkány hipofízis-sejtekben. E neuropeptid a secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide (VIP) szupercsaládba tartozik. Két amidált formája létezik, a PACAP38 (38 aminosavból áll) valamint a PACAP27, mindkettő azonos prekursorból származik. A PACAP szekvenciája rendkívüli módon konzervált a filogenezis során, az előgerinchúrosoktól az emlősökig. A halakban, kételtűekben található PACAP szerkezete csupán 1-4 aminosavban különbözik az emlősökben fellelhető PACAP peptidétől. A PACAP és G-protein kapcsolt receptorai széleskörű eloszlást mutatnak – elsősorban – az idegrendszerben és az endokrin szervekben. Mindez a PACAP fontos, az alapvető biológiai funkciók szabályozásában betöltött szerepére utal. PACAP receptor expresszálódik a patkány retina ganglion- és amakrin sejtjeiben, a horizontális sejtekben, valamint a belső rostos rétegben, és a fotoreceptorokban.

A PACAP számos funkcióban megnyilvánulhat, mint neurotranszmitter, hormon, trofikus faktor. Sokrétű működései közül kiemelendők a neurotrofikus és neuroprotektív hatások. A PACAP stimulálja a neuritok kinövését, sejt kultúrákban gátolja az apoptózist, védi a neuronokat a különböző neurotoxikus anyagok ellen, továbbá endogén protektív faktorként bizonyos neuronális sérülésekben fejt ki védő hatást.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A fenti irodalmi háttér alapján munkám során a következő célokat tűztem ki:

1. A pálcikák kalcium-áramaira jellemző kalcium-függő inaktiváció fiziológiai körülmények közötti mértékének meghatározása.
2. Annak igazolása, hogy a szinaptikus rés depléciója szintén közreműködik a pálcikák kalcium-áramainak fenntartott aktiváció alatti csökkentésében.
3. A glutamát transzporter-asszociált klorid-konduktancia aktivációjának a pálcikák kalcium-áramaira gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. A PACAP neuroprotektív hatásának igazolása a retinális neurotranszmisszió anoxia-indukált károsodásában.

III. MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A fotoreceptorokon végzett kísérleteinkhez lárvális stádiumban lévő foltos szalamandrákat (*Ambystoma tigrinum*) használtunk.

A horizontális sejteken folytatott vizsgálatainkat teknős (*Pseudemys scripta elegans*) hím- és nőivarú felnőtt egyedek felhasználásával végeztük.

Az állatokat 12/12 órás fény/sötét cikluson tartottuk.

A Ca^{2+} -függő inaktiváció és a szinaptikus rés depléciójának tanulmányozása

Perforált-patch whole-cell elvezetésekkel végeztünk szalamandra intakt terminálissal rendelkező izolált pálcikáiból, valamint retinális szeletben lévő pálcikákból. Az elvezetésekhez pórusformáló antibiotikumként gramicidint használtunk, az endogén Ca^{2+} -pufferelés és extrúziós mechanizmusok fenntartása céljából. Töltéshordozóként 1,8 mM Ca^{2+} -t vagy Ba^{2+} -t alkalmaztunk. A pálcikákat Axopatch 200B patch-clamp erősítővel -70 mV feszültségértéken tartottuk. „Ramp” feszültségváltozást (300 ms; -90 -tól $+60$ mV-ig) használtunk az I_{Ca} amplitudójának mérésére. A kontroll ramp-t 5 s időtartamú depolarizáló lépés követte (test-step), -70 mV-ról -40 , -30 , -20 , vagy -10 mV-ra. A depolarizáló lépés után 5 s-mal egy újabb feszültség-ramp következett, ezáltal mértük az I_{Ca} amplitudójában bekövetkező változásokat. Az elvezetett áramokat pClamp 8.1 szoftvert használva gyűjtöttük és analizáltuk.

A glutamát transzporterek aktivációjának hatása a preszinaptikus Ca^{2+} -áramokra

Perforált-patch whole-cell elvezetésekkel végeztünk szalamandra intakt terminálissal rendelkező izolált pálcikáiból, valamint retinális szeletben lévő pálcikákból. Az elvezetésekhez pórusformáló antibiotikumként gramicidint vagy nystatint használtunk. A sejteket 1,8 – 2 mM Ca^{2+} -t tartalmazó oldattal superfuzáltuk. A pálcikákat -70 mV feszültségértéken tartottuk. A Ca^{2+} -áramokat „ramp” feszültségváltozások (300 ms; -90 -tól $+60$ mV-ig) alkalmazásával 30 másodpercenként mértük.

Izolált pálcikák intracelluláris Cl^- -koncentrációját mértük, MEQ festék (6-methoxy-N-ethyl-quinolinium iodide) alkalmazásával. A digitális fluoreszcens képeket hűtött CCD kamera segítségével vettük fel. Az adatgyűjtés 5 vagy 10 másodpercenként az Axon Imaging Workbench (AIW 2.2) program használatával történt.

A PACAP hatása az anoxia-indukált változásokra horizontális sejteken

Teknősből nyert izolált eyecup szeletek felét nem-oxigenizált Ringer-oldatba, a másik felét ugyanezen összetételű, nem-oxigenizált, de 0,165 μ M PACAP-ot tartalmazó Ringer-oldatba helyeztük. Felhasználásig a szeleteket hűtőben, 4-6 °C-on tároltuk. Az intracelluláris elvezetések az izolált eyecup szeletek horizontális sejtjeiből a szem eltávolítása után 18, 22, 42 és 46 órával végeztük. Az 500 ms időtartamú fehér fényű stimulus 5500 ms intervallumon belül kétszer vetült a retinaszeletre. A fény-kiváltott válaszokat Axoclamp-2B erősítővel amplifikáltuk, az adatgyűjtés az Axoscope 8.0 programmal történt.

A horizontális sejteket a fénystimulusra adott hiperpolarizáló válaszaik alapján azonosítottuk, majd 20 nm-s lépésekben 360-700 nm között teszteltük a spektrális szenzitivitást. Kizárólag az L-típusú horizontális sejteket – melyek minden hullámhosszra hiperpolarizációval válaszoltak – tanulmányoztuk a továbbiakban.

Adatainkat páratlan t-teszt és egyutas ANOVA statisztikai próbák segítségével analizáltuk.

IV. EREDMÉNYEK

A Ca^{2+} -függő inaktiváció és a szinaptikus rés depléciójának szerepe a Ca^{2+} -áram szabályozásában

A Ca^{2+} -függő inaktiváció mértékének megállapítására (a szinaptikus rés Ca^{2+} -ionjai depléciójának hiányában) izolált pálcikákból végeztünk elvezetések, mely pálcikák rendelkeztek szinaptikus terminálissal, azonban posztzinaptikus kontaktust nem alkottak. Az extracelluláris Ca^{2+} fiziológiás koncentrációja (1,8 mM) mellett a Ca^{2+} -áramot (I_{Ca}) szinte teljesen gátolta az 5 s ideig tartó -10 mV-ra történő feszültséglépés ("test-step"). Ugyanezen protokoll a feszültséglépés kihagyásával (ezáltal a holding potenciál a két ramp között -70 mV maradt) az I_{Ca} -ban csupán minimális változásokat produkál. A -20 , -30 , -40 mV-ra történő feszültséglépések fokozatosan kisebb mértékben gátolják a Ca^{2+} -áramot mint azt a -10 mV-ra tett lépéseket követően tapasztaltuk. Különösen nagy fiziológiai jelentőséggel bír a -40 mV-nál való test-step – a pálcikák sötétben mért nyugalmi potenciáljához közeli értéken –, ami a Ca^{2+} -áram amplitudójának szignifikáns 15%-os csökkenését okozta.

A következőkben az 5 s időtartamú depolarizáló lépés Ca^{2+} -áramra gyakorolt hatását vizsgáltuk az izolált pálcikáknál intaktabb retinális szeletpreparátumban; 1,8 mM Ca^{2+} -t tartalmazó oldatot szuperfuzáltattunk. Az izolált pálcikákhoz hasonlóan az 5 s-os feszültséglépés -10 mV-on a Ca^{2+} -áram szinte teljes gátlását okozta. A -20 , -30 , -40 mV-ra történő lépések a I_{Ca} fokozatosan kisebb mértékű depolarizációját produkálták. A retinális szeletekben a Ca^{2+} -áram csökkenése szignifikánsan nagyobb volt a -30 mV-ra és -40 mV-ra való lépéseknél mint az izolált sejtekben. A szeletekben a test-step -40 mV-on átlagosan 47%-kal gátolta a Ca^{2+} -áramot. Tehát a retinális szeletek pálcikáinak Ca^{2+} -áramait a sötétben mérhető nyugalmi potenciál körüli értéken fenntartott depolarizáció jelentősen csökkenti.

A szeletpreparátumban a pálcikákat extracelluláris tér veszi körül, valamint posztzinaptikus elemükkel kontaktust létesítenek, míg az izolált pálcikák a fenti tulajdonságokkal nem rendelkeznek. A depolarizáló lépések a Ca^{2+} -áramok jelentősen nagyobb mértékű gátlását produkálták a szeletekben, mint az izolált sejtekben. Mindez arra a lehetőségre enged következtetni, hogy a szeletekben a szinaptikus depléción is hozzájárulhat a Ca^{2+} -áramok gátlásához. E lehetőség igazolására a továbbiakban – a Ca^{2+} -t Ba^{2+} -mal helyettesítve – megkíséreltük minimalizálni a I_{Ca} inaktivációját.

Az ionfüggő gátlás a Ba^{2+} jelenlétében is fennmaradt a -40 , -30 , -20 és -10 mV-ra való feszültséglépést követően. A -10 mV-ra történő lépés a Ba^{2+} -áram szignifikánsan kisebb inhibícióját produkálta mint a Ca^{2+} esetében megfigyelt inhibíció. Ba^{2+} töltéshordozó esetén, a Ca^{2+} -hoz hasonlóan, a depolarizáló lépést követő gátlás a szeletben lévő pálcikák esetében nagyobb volt, mint az izolált sejtekben. Ez a különbség szignifikáns a -40 mV-ra és a -10 mV-ra való lépéseknél.

Összehasonlítva a különböző sejtek áramait; az áramok amplitudója nem korrelált szignifikánsan a -40 , -30 , -20 vagy -10 mV-ra való lépések következtében létrejövő gátlás mértékével, a négyféle kondíció egyikében sem.

Az I_{Ca} és az I_{Ba} csökkenésének időbeli lefolyása egyszeres exponenciálissal írható le. A Ca^{2+} -áram csökkenésének időkonstansa nem különbözik szignifikánsan a négy eltérő kondícióban, átlaga $1,7 \pm 0,1$ s.

Az áram visszaállása az eredeti értékre – a -10 mV-ra való depolarizáló lépés után – viszonylag lassú volt, az átlagolt időkonstansok: 4,4 s (I_{Ba} -ra, izolált sejtekben); 11,1 s (I_{Ba} -ra, szeletben); 12,5 s (I_{Ca} -ra, izolált pálcikákban); 73,5 s (I_{Ca} -ra, szeletben). A regenerálódás sebessége a négyféle kondícióban szignifikánsan különbözött. A Ba^{2+} -áram inaktiváció utáni

regenerálódásának időbeli lefolyása jelentősen gyorsabb mint a Ca^{2+} -áram helyreállása. A regeneráció időkonstansait az inhibíció mértékével összehasonlítva kitűnik, hogy a Ba^{2+} -áram gyorsabb helyreállása összefüggésben van azzal a ténnyel, hogy Ba^{2+} töltéshordozó esetén a -10 mV-ra történő lépés által produkált inaktiváció kisebb, mint Ca^{2+} alkalmazásakor. A szeletben lévő sejtek áramainak regenerálódása jóval lassabb volt, mint az izolált sejteké. Kevés kivétellel a szeletek pálcikáinak lassabb helyreállása függetlennek bizonyult az áram gátlásának mértékétől vagy a használt töltéshordozótól.

A glutamát transzporterek aktivációjának hatása a preszinaptikus Ca^{2+} -áramokra

Átlagosan, a 0.1 mM glutamát $21,5$ % -ban gátolta a Ca^{2+} -áramot, az 1 mM glutamát adása pedig $34,1$ -ban. A kétféle koncentráció között a Ca^{2+} -áram gátlásában szignifikáns különbség mutatkozott. A glutamát-kiváltott gátlás reverzibilis, a mosást követően az I_{Ca} helyreállt. A glutamát növelte a membrán-konduktanciát és bemenő áramot produkált, melynek fordulási potenciálja -29 mV. Ez nem különbözik szignifikánsan a klorid egyensúlyi potenciáljától (E_{Cl}).

A különböző mGluR agonisták: t-ADA (Group I agonista) DCG-IV (Group II), L-AP4 (Group III) egyike sem fejtett ki szignifikáns hatást az I_{Ca} -ra. A glutamát transzporter inhibitor TBOA jelenlétében a glutamát nem gátolta a Ca^{2+} -áramot. Továbbá, ha a TBOA-t önmagában, glutamát nélkül alkalmaztuk, az I_{Ca} változatlan maradt. Átlagosan, $0,1$ mM D-aszpartát (glutamát transzporter szubsztát) a Ca^{2+} -áramot $16,0$ %-kal gátolta, 1 mM D-aszpartát az I_{Ca} szignifikánsan nagyobb inhibícióját produkálta ($35,1$ %). Izolált pálcikák terminálisaiából történő elvezetéskor a $0,1$ mM glutamát szintén gátolta a Ca^{2+} -áramot, jelezve, hogy az I_{Ca} inhibíciója nem tulajdonítható (space-clamp) artefaktumnak.

Az imaging kísérletek eredményei az MEQ fluoreszcencia glutamát-kiváltott növekedését mutatják, mely az intracelluláris Cl^- -koncentráció csökkenésére utal. $0,1$ mM glutamát átlagosan $4,32$ % relatív MEQ-fluoreszcencia-növekedést produkált a szinaptikus terminálisban. Nagyobb koncentráció, 1 mM glutamát adása szignifikánsan nagyobb, $102,7$ % relatív MEQ-fluoreszcencia-növekedést okozott. A D-aszpartát szintén az intracelluláris Cl^- -koncentráció csökkenését váltotta ki. Glutamát aplikációja TBOA vagy DHKA (glutamát transzporter inhibitorok) jelenlétében nem okozott szignifikáns változásokat a pálcikaterminálisok Cl^- -koncentrációjában. TBOA vagy DHKA alkalmazása, glutamát hiányában, változatlanul hagyta a terminális Cl^- -koncentrációját. A glutamát agonista NMDA, AMPA, kainát és $1\text{S},3\text{R}$ -ACPD nem produkált Cl^- -effluxot az izolált pálcikák terminálisából. A nystatinnal és alacsony Cl^- -szinttel végzett terminális elvezetéseknel a glutamát nem gátolta a Ca^{2+} -áramot, tehát a Cl^- -efflux alapvető fontosságú a Ca^{2+} -áram glutamát-kiváltott gátlásához.

A PACAP hatása az anoxia-indukált változásokra horizontális sejteken

Fényadaptált kontroll és fényadaptált PACAP38-kezelt eyecup preparátum horizontális sejtjeiből intracelluláris elvezetéseket végeztünk négy különböző időpontban (18 , 22 , 42 és 46 órával a szem eltávolítása után). A membránpotenciál hasonló értékeket mutatott a kontroll és a PACAP-kezelt sejtekben, valamint időben nem változott. A PACAP nem gyakorolt akut hatást a horizontális sejtek válaszára. Mind a kontroll, mind a PACAP-inkubált retinális szeletek sejtjeinek fényválasza egy jellegzetes csúcsamplitúdóval rendelkező gyors kezdeti tranziens komponensből, továbbá az ún. rollback fázisból állt, amit a repolarizációs fázis követett. Későbbi időpontokban (42 és 46 óra után) a kontroll sejtek kezdeti tranziense csökkent, a csúcsamplitúdó szintén csökkent, majd a $46.$ órára eltűnt. Ezzel ellentétben a PACAP-kezelt sejtek eredeti csúcsválaszai megmaradtak. A kontroll sejtekben a fény-kiváltott válaszok rollback és repolarizációs fázisa lelassult, míg a PACAP-kezelt retinában ugyanezen folyamatok sokkal kisebb mértékben jelentek.

A fényválaszok amplitúdói – a 0. óra kivételével – minden időpontban nagyobbak voltak a PACAP-indukált szeletekben, mint a kontroll retinaszeletekben. 18 és 22 óra után a PACAP-kezelt sejtek válaszamplitúdói kb. 1,2-szeresen felülmúlták a kontroll horizontális sejteket. A későbbi időpontokban (42 és 46 óra után) ez a különbség több mint 2-szeresére növekedett. A PACAP-indukált sejtek fényválaszainak amplitúdói 46 órán át közel változatlanok maradtak, míg a kontroll sejtek válaszamplitúdói jelentősen csökkentek. Ez utóbbi értékek szignifikáns mértékben a 22. és 42. óra között változtak.

V. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

1-2. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a Ca^{2+} -függő inaktiváció és a szinaptikus rés Ca^{2+} -ionjainak depléciója együtt szabályozza a pálcikák Ca^{2+} -áramait fiziológiai körülmények között. A sötétben mérhető nyugalmi membránpotenciálra (-40 mV) történő hosszú depolarizáló lépés a Ca^{2+} -áram szignifikáns (~ 15%-os) inaktivációját produkálta izolált pálcikákban. A szeletekben lévő, szinaptikus kontaktussal rendelkező pálcikákban a -40 mV-ra való depolarizáló lépés a Ca^{2+} -áram még jelentősebb (~ 47%-os) csökkenését okozta. Ezen erőteljesebb inhibíció – az inaktiváció mellett – a szinaptikus rés Ca^{2+} -ionjainak a fenntartott Ca^{2+} -influx következtében fellépő deplécióját tükrözi.

3. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a pálcika-terminálisok glutamát transzportereinek aktivációja gátolja a preszinaptikus Ca^{2+} -áramokat. Elektrofiziológiai eredményeink szerint a glutamát nem a receptorain, hanem a glutamát transzportereken keresztül gátolja a pálcikák Ca^{2+} -áramait. Cl^- -imaging technikával kimutattuk, hogy a glutamát transzporterek aktivációja Cl^- -effluxot generál. Ismert, hogy a Cl^- -efflux gátolja a pálcikák terminálisainak Ca^{2+} -csatorna aktivitását. Tehát a glutamát transzporterek aktivációja Cl^- -effluxot produkál, amely gátolja a pálcikák Ca^{2+} -áramait. A pálcikák terminálisaiából felszabaduló glutamát neurotransmitter e mechanizmus által, negatív visszacsatolással gátolja a további glutamát-felszabadulást.

4. Igazoltuk, hogy a PACAP neuroprotektív hatást fejt ki a retinális sejtek anoxia-indukált károsodásában. Teknős PACAP-kezelt eyecup szeleteiben a horizontális sejtek fényválaszai 42 óra oxigénpriváció után is stabilak maradtak és a kontroll sejtekből elvezetett válaszoknál szignifikánsan nagyobbak mutatkoztak.

A külső retinában lezajló transzmissziós folyamatokat a fotoreceptorokból felszabaduló glutamát másodlagos neuronokon elhelyezkedő receptoraihoz történő kötődésén kívül számos neurotransmitter (pl.: dopamin, somatostatin, adenozin) és ion (pl.: Cl^- , Ca^{2+} , Zn^{2+}) befolyásolhatja mind preszinaptikusan: a transzmitter-kibocsátás regulációja által; mind posztzinaptikusan: a másodrendű neuronok szenzitivitásának szabályozásával.

A Ca^{2+} -függő inaktiváció és a szinaptikus rés depléciója a Ca^{2+} -áram amplitúdójának regulációjával, és ezáltal a pálcika szinaptikus kimenetének kontrolljával a) határt szab a depolarizált állapot alatti, sejtkárosodást okozó túlzott Ca^{2+} -beáramlásnak, valamint b) közreműködik a másodrendű sejtek fényadaptációjában úgy, hogy a pálcikák fény-kiváltott hiperpolarizációja alatt bekövetkező Ca^{2+} -áram csökkenést mérsékeli, ezáltal elősegíti a Ca^{2+} -áram regenerációját.

A sötétben a pálcikákból folyamatosan felszabaduló glutamát a bipoláris sejteken lévő receptoraihoz kötődve az ON-bipoláris sejteket hiperpolarizált állapotban tartja, az OFF-bipolárisokat depolarizálja (kételtűekben a pálcikák mind az ON-, mind az OFF-bipoláris sejtekhez kapcsolódnak). Tehát a pálcikák feszültségfüggő Ca^{2+} -áramainak gátlása következtében csökkenő transzmitter-felszabadulás csökkentheti a bipoláris sejtek fényérzékenységét.

Hasonlóan, a sötétben a fotoreceptorok által kibocsátott glutamát – a bipoláris sejtek központ-környék organizációjának létrehozásáért felelős – horizontális sejteket depolarizálja.

Azonban, ha a glutamát-felszabadulás a Ca^{2+} -áramok gátlása miatt csökken, a kontrasztérzékelés is mérséklődhet.

A szinaptikus működés fenntartásának alapvető feltétele, hogy a másodlagos messenger rendszerek intakt állapotban fennmaradjanak, ezt biztosítják az endogén neuroprotektív faktorok (PACAP, VIP, BDNF), melyek a retinát ért neurodegeneratív hatások kivédésében játszanak jelentős szerepet. A PACAP-pal folytatott kísérleteink eredményei mutatják, hogy e neuroprotektív anyag alkalmazásával, 48 óra anoxiás állapotot követően a sejtekben nem történnek struktúrális változások, sőt, a neurotranszmisszió épségének következtében a sejtválaszok is fennmaradnak.

A fentiekből kitűnik, hogy a fotoreceptorok mikrokörnyezetének modulációja, valamint a retina távolabbi (parakrin módon ható) faktorainak hatásai egyaránt fontos szerepet töltenek be a neurotranszmisszió szabályozásában, ill. a normális szinten tartásában.

VI. PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció témájából megjelent referált közlemények

Rábl K, Thoreson WB (2002) Calcium-dependent inactivation and depletion of synaptic cleft calcium ions combine to regulate rod calcium currents under physiological conditions. *Eur J Neurosci* 16, 2070-7

Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábel R, Arimura A (2002) PACAP inhibits anoxia-induced changes in physiological responses in horizontal cells in the turtle retina. *Regul Peptides* 109, 71-4

Rábl K, Bánvölgyi T, Gábel R (2002) Electrophysiological evidence for push-pull interactions in the inner retina of turtle. *Acta Biol Hungarica* 53, 141-151.

Gábel R, **Rábl K**, Veisenberger E (2000) Synaptology of the inner plexiform layer in the anuran retina. *Microsc Res Tech* 50, 394-402

Thoreson WB, Bryson EJ, **Rábl K** (2003) Reciprocal interactions between calcium and chloride in rod photoreceptors. *J Neurophysiol* (Apr 30, in press)

Rábl K, Bryson EJ, Thoreson WB (2003) Activation of glutamate transporters in rod terminals inhibits presynaptic calcium currents. (közlésre benyújtva)

Thoreson WB, **Rábl K**, Townes-Anderson E, Heidelberger R (2003) A highly Ca^{2+} -sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse. (közlésre benyújtva)

A disszertáció témájából megjelent konferenciai prezentációk

Rábl K, Thoreson WB (2002) Calcium-dependent inactivation and depletion of synaptic cleft calcium ions regulate the amplitude of rod calcium currents under physiological conditions. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA

Rábl K, Bryson EJ, Thoreson WB (2003) Activation of glutamate transporters in rod terminals inhibits presynaptic calcium currents. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA

Thoreson WB, **Rábl K**, Heidelberger R (2002) Linearity between calcium influx and exocytosis at the rod photoreceptor synapse. FASEB Conference, Saxtons River, USA

Rábl K, Thoreson WB (2002) Calcium-dependent inactivation and depletion of synaptic cleft calcium ions regulate rod calcium currents under physiological conditions. FASEB Conference, Saxtons River, USA

Heidelberger R, Thoreson WB, **Rábl K**, Townes-Anderson E (2003) Properties of exocytosis at the rod photoreceptor terminal. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA

Rábl K, Bánvölgyi T, Veisenberger E, Vigh J, Gábrriel R (2001) Reserpin-érzékeny sejtek intracelluláris analízise teknős retinában. Magyar Idegtudományi Társaság VIII. Konferenciája, Szeged

Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábrriel R, Arimura, A. (2001) The neuroprotective effect of PACAP on horizontal cells in the turtle retina. Regul Peptides 102: 65

Rábl K, Reglődi D, Bánvölgyi T, Somogyvári-Vigh A, Lengvári I, Gábrriel R, Arimura A (2002) The effect of PACAP on the survival of horizontal cells of the turtle retina- an electrophysiological study. Magyar Idegtudományi Társaság IX. Konferenciája, Debrecen

Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Németh J, Lubics A, Józsa R, Jakab B, Tamás A, **Rábl K**, Gábrriel R, Toller G, Meggyesi R, Weiland V, Lengvári I, Arimura A (2001) Comparative distribution of PACAP and VIP in the nervous system of vertebrate and invertebrate species. Regul Peptides 102: 64

Egyéb referált közlemény

Kis Z, Farkas T, **Rábl K**, Kis E, Kóródi K, Simon L, Marusin I, Rojik I, Toldi J (1999) Comparative study of the neuronal plasticity along the neuraxis of the vibrissal sensory system of adult rat following unilateral infraorbital nerve damage and subsequent regeneration. *Exp Brain Res* 126 (2), 259-69

Egyéb konferenciai prezentáció

Kis Zs, **Rábl K**, Kiss E, Kóródi K, Simon L, Farkas T, Toldi J (1998) Neuronal plasticity of somatosensory system of adult rat following denervation. Magyar Élettani Társaság 62. Konferenciája, Pécs